

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra parazitologie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Parasitology**

Doktorský studijní program: Parazitologie
Ph.D. study program: Parasitology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Biogenesis of mitochondria in parasitic protist *Trypanosoma brucei*

Biogeneze mitochondrií parazitického prvoka *Trypanosoma brucei*

Mgr. Jan Mach

Školitel/Supervisor: prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Praha, 2016

Obsah / Contents

Czech version / Česká verze2

Abstrakt	3
Úvod	4
Cíle práce.....	5
Materiál a metody.....	6
Výsledky a diskuze.....	6
Seznam citované literatury	8
Publikace	9

English version / Anglická verze.....11

Abstract	11
Introduction	12
The aims of the thesis	13
Material and methods	14
Results and discussion.....	14
References	16
Publications	17

Curriculum vitae 18

Financial support 20

Czech version / Česká verze

Abstrakt

Výzkum zaměřený na mitochondrie, včetně jejich redukováných forem, jako jsou hydrogenosomy a mitosomy, vedl v poslední době u této nepostradatelné organely k objevu nečekané diverzity. Je zajímavé, že mitochondrie parazitického prvoka *Trypanosoma brucei* je schopna, v závislosti na dostupných zdrojích uhlíku, projít pozoruhodnými funkčními a strukturními změnami. Mimoto bylo navrženo, že trypanosomy patří mezi nejstarší známá eukaryota a jako taková vzbuzuje jejich mitochondrie u biologů o to větší zájem. Abychom přispěli k poznání mitochondriální biogeneze a funkce, zaměřili jsme se na studium dvou klíčových mitochondriálních procesů, štěpení preproteinů importovaných do mitochondrie a mechanismus transportu pyruvátu do těchto organel. Navíc jsme studovali příjem železa do *T. brucei*. Tento kov je nezbytný pro funkci mnoha proteinů, především pro železo-sírné mitochondriální proteiny.

Evoluční historie trypanosom a jejich mitochondrie je sporná. Na základě některých zpráv představuje mitochondrie trypanosom původní formu této organely, což je podpořeno objevením domnělé archaické translokázy vnější mitochondriální membrány (ATOM) a jediného typu translokázy, tvořící pór na vnitřní mitochondriální membráně. My jsme naopak identifikovali a charakterizovali mitochondriální procesující peptidázu v matrix mitochondrie a dvě podjednotky core proteinů navázané na vnitřní mitochondriální membránu s vlastnostmi podobnými těm popsaným u metazoi a hub. Vysoce vyspělé mitochondriální peptidázy a srovnatelné N-koncové mitochondriální presekvence, které směřují proteiny do mitochondrie trypanosomy, nepodporují starobylou povahu této organely. Dále jsme zkoumali záhadný transportér pyruvátu do mitochondrie (MPC), nacházející se na vnitřní mitochondriální membráně a objasnili jsme jeho funkci u procyklických a krevních stádií *T. brucei*. Vlastnosti MPC u *T. brucei* se ukázaly být obdobné jako u dříve popsaných MPC člověka, kvasinky a octomilky. Navíc jsme popsali mechanismus příjmu železa, který je nedostatečně prozkoumán u procyklických stádií *T. brucei*. Objevili jsme, že procyklické trypanosomy jsou schopné přijímat železo z železitých komplexů pomocí redukčního mechanismu, což může být přínosné pro parazita ve střevech hmyzu a který je srovnatelný s kvasinkovým.

Celkově vzato naše výsledky nepodporují starobylou povahu mitochondrie *T. brucei*. Zdá se pravděpodobnější, že představuje vysoce vyspělou a univerzální organelu, která je v mnoha směrech srovnatelná s mitochondriemi ostatních eukaryot.

Úvod

Vnitřní buněčná stavba je jeden z hlavních znaků, které odlišují eukaryotickou buňku od prokaryotické. Rozdělení různých drah do odlišných částí buňky se ukázalo být evolučně úspěšným. Tento přístup pravděpodobně umožnil eukaryotům větší flexibilitu a efektivitu v metabolických procesech, především fixaci energie (Martin *et al*, 2015). Takto získaná výhoda je patrná z rozšíření eukaryotických linií a vývinu mnohobuněčných organismů (Adl *et al*, 2012). Vnitřní membránový systém pochází pravděpodobně z eukaryotické buňky, zatímco, jak je všeobecně uznáváno, mitochondrie a chloroplasty byly získány v průběhu evoluce pohlcením bakteriálního symbionta. Jednou z nejstudovanějších eukaryotických organel je mitochondrie. Mitochondrie je pozůstatek α -proteobakteriálního endosymbionta, který žil v pre-eukaryotické nebo dávné eukaryotické buňce (Pittis & Gabaldón, 2016). Během evoluce některé mitochondrie ztratily DNA a mnoho metabolických drah. Ve většině organismů slouží mitochondrie jako ATP-produkující organela, využívající Krebsův cyklus, beta-oxidaci mastných kyselin a oxidativní fosforylaci. Navíc mitochondrie obsahuje další nezbytné dráhy či jejich části, jako například tvorba železo-sírných center, syntéza hemu a steroidů, metabolismus aminokyselin a programovaná buněčná smrt. Biogeneze mitochondrie je složitý proces: 1) Eukaryotická buňka nedokáže vytvářet mitochondrie *de novo*, musí zajistit jejich množení a rozdělení do dceřinných buněk. 2) Většina proteinů a dalších látek musí být transportována do mitochondrie, aby byly zajištěny nezbytné mitochondriální funkce. Z tohoto důvodu si buňky vyvinuly složitý transportní mechanismus mitochondriálních proteinů a vysoce kontrolované mitochondriální transportéry ostatních nezbytných látek.

Trypanosoma brucei je lékařsky a veterinárně významný jednobuněčný parazit lidí a zvířat přenosný mouchou Tse-tse v Africe. Různá prostředí uvnitř těchto dvou hostitelů kladou různé nároky na metabolismus trypanosomy a její reakci na imunitní odpověď hostitele. Jediná mitochondrie, nacházející se v buňce trypanosomy, je obzvláště zajímavá kvůli jejím dramatickým změnám v metabolismu a morfologii mezi krevní (BSF) a hmyzí formou (PCF). V této práci shrnuji dosavadní znalosti o energetickém metabolismu mitochondrie trypanosomy, transportu a štěpení mitochondriálních proteinů a transportu a metabolismu železa a srovnání těchto drah s mitochondriemi modelových eukaryotických organismů *Saccharomyces cerevisiae* a *Homo sapiens*. Práce je zaměřená především na několik konkrétních drah, které nám mohou

pomoci porozumět vývoji a funkci mitochondrie *T. brucei*. Nejzásadnější rozdíly v energetickém metabolismu *T. brucei* jsou: 1) Krebsův cyklus, který nefunguje jako cyklus, přestože všechny jeho enzymy jsou přítomny (van Hellemond *et al*, 2005; Tielens & van Hellemond, 2009) a 2) neobvyklá oxidativní fosforylace s dvěma nestandardními enzymy dodávajícími elektrony [glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (Guerra *et al*, 2006) a alternativní NADH dehydrogenáza (Fang & Beattie, 2002)], alternativní terminální oxidázou a ATP syntázou, která u krevních stádií funguje v opačném směru než je obvyklé. Velmi odlišná je u *T. brucei* také dráha transportu proteinů do mitochondrie, kde byla objevena archaická translokáza vnější mitochondriální membrány (ATOM), která se vyskytuje pouze u trypanosom (Pusnik *et al*, 2011) a jediný protein tvořící pór ve vnitřní mitochondriální membráně (Singha *et al*, 2008). Paraziti jako je *T. brucei*, kteří žijí v rozdílných hostitelích musí být velmi flexibilní a dokázat přizpůsobit příjem a zacházení se železem. Příjem železa je značně závislý na konkrétní životní fázi a zahrnuje proteiny specifické pro trypanosomy. Navíc trypanosomy ztratily schopnost syntézy hemu a potřebují získávat hem od hostitele (Kořený *et al*, 2010). Většina železa se používá v dráze syntézy železo-sírných center, která byla intenzivně studována a ukázala se být srovnatelná s ostatními eukaryotickými modely.

Cíle práce

- 1) Charakterizovat štěpení proteinů cílených do mitochondrie se zaměřením na:
 - a. charakterizaci N-koncové mitochondriální importní sekvence.
 - b. charakterizaci mitochondriální procesující peptidázy.
 - c. fylogenetickou analýzu mitochondriálních core proteinů a mitochondriální procesující peptidázy.
- 2) Charakterizovat domnělý mitochondriální transportér pyruvátu v různých životních fázích *T. brucei*.
- 3) Charakterizovat mechanismus příjmu železa v hmyzím stádiu *T. brucei*.

Materiál a metody

Veškerý použitý materiál a metody jsou vyjmenovány v příložených publikacích. Zde je uveden pouze výčet nejdůležitějších metod:

- příprava rekombinantních proteinů v *Escherichia coli* a příprava protilátek v potkanech
- lokalizace proteinů pomocí imunofluorescenční mikroskopie a SDS-PAGE následované Western blot analýzou
- izolace buněčných frakcí *T. brucei* a měření enzymatických aktivit
- *in silico* analýza (tvorba fylogenetických stromů, alignmentů atd.)
- HPLC analýza

Výsledky a diskuze

Evoluční původ mitochondrie trypanosom je dlouhodobě diskutované téma. Vyskytují se dvě rozdílné otázky. Zda je mitochondrie trypanosom starobylá nebo vysoce divergentní. Původní zprávy o velmi krátkých N-koncových mitochondriálních importních sekvencích (N-MTS) a odlišném mechanismu transportu proteinů byly interpretovány jako starobylá vlastnost; my jsme naopak ukázali, že velmi odlišné nebo chybějící dráhy mohou odrážet adaptaci na parazitizmus.

Analýza predikovaných 336 N-MTS u proteinů *T. brucei* neukázala žádný signifikantní rozdíl v celkovém náboji, délce nebo motivu v místě štěpení v porovnání s běžnými N-MTS *Saccharomyces cerevisiae*. V genomu *T. brucei* jsme objevili α a β podjednotky mitochondriální procesující peptidázy (MPP) se smyčkou bohatou na glycin, respektive s doménou vázající zinek. Dále pak dvě podjednotky paralogů MPP, takzvaných core proteinů (cp1 a cp2), které jsou asociované s komplexem III dýchacího řetězce, ale bez domén potřebných k aktivitě. Fylogenetická analýza odhalila, že všechny eukaryotické linie mají stejný typ proteinů z rodiny MPP/core proteinů, zatímco cp1 podjednotka se vyvinula nezávisle na β -MPP její duplikací u metozoí, některých hub a kinetoplastidů. Myslíme si, že vývoj cp1 umožnil nezávislou regulaci mitochondriálního dýchacího řetězce a importu proteinů. Tyto výsledky podporují hypotézu, která ukazuje mitochondrii trypanosom jako velmi vyvinutou a přizpůsobenou na parazitický

životní styl, spíše než starobylou. Výsledky charakterizace N-MTS a procesujících peptidáz byly publikovány v článku: Mach *et al.* (2013) *Genome Biol Evol.* 5(5):860-75.

Pyruvát je klíčový meziprodukt energetického metabolismu u PCF a koncový produkt u BSF. Již mnoho let je známo, že je pyruvát aktivně transportován přes mitochondriální membránu a že transport je poháněný pomocí pH, společně s pyruvátem je přenášený proton a inhibovaný je látkou UK-5099. Nicméně molekulární povaha domnělého mitochondriálního pyruvátového transportéru (MPC) nebyla do nedávné doby známa. Ukázalo se, že MPC se skládá ze dvou paralogních podjednotek MPC1 a MPC2. My jsme objevili homology obou proteinů v genomu *T. brucei*. Obě podjednotky se nacházejí na vnitřní mitochondriální membráně a ukázali jsme, že jsou opravdu zodpovědné za import pyruvátu do mitochondrie *T. brucei*. Překvapivě je snížení importu pyruvátu u buněk bez MPC pouze částečné, což přináší otázku, co je zodpovědné za ostatní pyruvát přenášený do mitochondrie. MPC není nezbytný pro růst trypanosom v médiu bohatém na glukózu, ale v médiu bez glukózy je růst BSF významně pomalejší. Experimentální infekce myši odhalily, že kmen buněk bez MPC způsobuje nižší parazitěmii a zároveň i mortalitu v porovnání s divokým kmenem *T. brucei*. Také jsme pozorovali dramatické změny v metabolismu glukózy u PCF a BSF buněk bez MPC. Předpokládáme, že pyruvát by mohl být nezbytný pro syntézu mitochondriálního alaninu glutamát dehydrogenázou a že se importu pyruvátu do mitochondrie účastní ještě jiný přenašeč nebo dráha. Výsledky studie o MPC byly publikovány v článku: Štáfková *et al.*, (2016). *Mol Microbiol.* [Epub ahead of print].

Mechanismus získání železa byl objasněn u BSF před mnoha lety, nicméně je tato dráha stále neznámá pro buňky PCF. BSF používají specifický receptor pro transferrin, pro získání dostatku železa z prostředí. My jsme objevili, že PCF jsou schopné získávat železo odlišným mechanismem než BSF v savčím hostiteli. V hmyzím hostiteli není příjem železa přes transferrin využíván. Ukázali jsme, že PCF *T. brucei* získává železo pomocí redukce malých železitých komplexů a následným transportem železnatých iontů do buňky. Také jsme objevili v genomu *T. brucei* možné železité reduktázy spolu s několika domnělými transportéry kovů, které se mohou účastnit importu železa. Námi naměřená efektivita příjmu železa je srovnatelná s procesem dříve charakterizovaným u kvasinek. Redukce železitých komplexů a následný transport železa by mohl být nezbytný především v hmyzím prostředí bez savčího transferrinu a

s důrazem na plně vyvinutou mitochondrii u PCF. Výsledky z pokusů příjmu železa u PCF byly publikovány v článku: Mach *et al*, (2013) *J Parasitol.* 99(2):363-4.

Seznam citované literatury

Adl S.M., Simpson A.G.B., Lane C.E., Lukeš J., Bass D. et al (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59**: 429–493

Fang J. and Beattie D.S. (2002). Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* **123**: 135–142

Guerra D.G., Decottignies A., Bakker B.M. and Michels P.A.M. (2006). The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosomatidae* and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania spp.* *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**: 155–169

van Hellemond J.J., Opperdoes F.R. and Tielens A.G.M. (2005). The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 967–971

Kořený L., Lukeš J. and Oborník M. (2010). Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all? *Int. J. Parasitol.* **40**: 149–156

Lang B.F., Gray M.W. and Burger G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 351–97

Lombardo M.E., Araujo L.S. and Batlle A. (2003). 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 1263–71

Martin W.F., Garg S. and Zimorski V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**: 20140330

Pittis A.A. and Gabaldón T. (2016). Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature*: [Epub ahead of print]

Pusnik M., Schmidt O., Perry A.J., Oeljeklaus S., Niemann M. et al (2011). Mitochondrial preprotein translocase of trypanosomatids has a bacterial origin. *Curr. Biol.* **21**: 1738–1743

Salzman T.A., Stella A.M., Wider de Xifra E.A., Batlle A.M., Docampo R. et al (1982). Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **72**: 663–7

Singha U.K., Peprah E., Williams S., Walker R., Saha L. et al (2008). Characterization of the mitochondrial inner membrane protein translocator Tim17 from *Trypanosoma brucei*. *Mol.*

Biochem. Parasitol. **159**: 30–43

Tielens A.G.M. and van Hellemond J.J. (2009). Surprising variety in energy metabolism within *Trypanosomatidae*. *Trends Parasitol.* **25**: 482–490

Verner Z., Basu S., Benz S., Dixit S., Dobáková E. et al (2015). Malleable mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **315**: 73–151

Verner Z., Škodová I., Poláková S., Durišová-Benkovičová V., Horváth A. et al (2012). Alternative NADH dehydrogenase (NDH2): intermembrane-space-facing counterpart of mitochondrial complex I in the procyclic *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **140**: 328–37

Publikace

Štáfková J, Mach J, Biran M, Verner Z, Bringaud F, Tachezy J. (2016). Mitochondrial pyruvate carrier in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* [Epub ahead of print]. (IF = 4,4)

Mach J, Poliak P, Matusková A, Žárský V, Janata J, Lukeš J, Tachezy J. (2013). An advanced system of the mitochondrial processing peptidase and core protein family in *Trypanosoma brucei* and multiple origins of the core I subunit in eukaryotes. *Genome Biol Evol.*, 5(5):860-75. (IF = 4,2)

Mach J, Tachezy J, Šut'ák R. (2013). Efficient iron uptake via a reductive mechanism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Parasitol.*, 99(2):363-4. (IF = 1,2)

English version / Anglická verze

Abstract

In last decade, investigations of mitochondria including their various reduced forms such as hydrogenosomes and mitosomes revealed unexpected diversity of this indispensable organelle. Interestingly, the single mitochondrion of parasitic protist *Trypanosoma brucei* is able to undergo remarkable functional and structural changes reflecting available carbon sources. Moreover, it was proposed that trypanosomes belong among the most ancient eukaryotes and as such, their mitochondria raised high attention of biologists. To contribute to the knowledge of mitochondrial biogenesis and function, we focused on studies of two key mitochondrial processes, the processing of preproteins that are imported to the mitochondria, and mechanism of pyruvate transport to these organelles. Moreover, we also investigated uptake of iron by *T. brucei*. This metal is essential for function of numerous proteins, particularly for iron-sulfur proteins in mitochondria.

Evolutionary history of trypanosomes and their mitochondrion is a question of debates. According to some reports, mitochondrion of trypanosomes represent an ancient form of this organelle, which is supported by identification of putative "archaic" translocase of the outer mitochondrial membrane (ATOM) and finding of only a single type of translocation pore in mitochondrial inner membrane. On the contrary, we identified and characterized mitochondrial processing peptidase within the mitochondrial matrix and two subunits of core proteins bound to the mitochondrial membrane with similar characters as those described in metazoans and fungi. Presence of highly evolved mitochondrial peptidases and comparable N-terminal mitochondrial presequences that target proteins to the trypanosomal mitochondrion do not support ancient character of this organelle. Further, we investigated an enigmatic mitochondrial pyruvate carrier (MPC) in inner mitochondrial membrane and characterized its function in procyclic and bloodstream forms of *T. brucei*. The character of *T. brucei* MPC appeared to be similar to previously discovered MPC in human, yeast and fruit fly. Additionally, we studied mechanism of iron uptake, which is poorly understood in procyclic form of *T. brucei*. We found that procyclic *T. brucei* is able to acquire iron from ferric complexes via a reductive mechanism, which can be beneficial for the parasite within the insect gut and which is comparable to mechanism used by yeast.

Taken together, our results do not support the ancient character of *T. brucei* mitochondrion. It seems more likely that it represents a highly evolved and versatile organelle, which is comparable in many characters with other eukaryotes.

Introduction

Compartmentalization is one of the major properties, which distinguish eukaryotic cell from prokaryotes. To distribute various pathways among distinct compartments has proved to be evolutionary successful step. It probably allowed eukaryotes to be more flexible and effective in metabolic processes, particularly in energy fixation (Martin *et al*, 2015). The beneficial effect is apparent from the appearance of wide diversification of eukaryotic lineages and evolving of multicellular organisms (Adl *et al*, 2012). The endomembrane system originates possibly from the eukaryotic cell itself, whereas it has been generally accepted that mitochondria and chloroplast were acquired in the course of evolution by engulfing of bacterial endosymbionts. One of the most studied eukaryotic organelle is the mitochondrion. The mitochondrion is believed to be a remnant of α -proteobacterial endosymbiont, which lived within a pre-eukaryotic or ancient eukaryotic cell (Pittis & Gabaldón, 2016). During the evolution, some mitochondria lost their DNA and many pathways. In most organisms, mitochondrion serves as ATP-producing organelle, utilizing tricarboxylic acid cycle, beta-oxidation of fatty acids and oxidative phosphorylation. In addition, other essential pathways or their parts such as iron-sulfur cluster assembly, heme and steroids synthesis, amino acid metabolism and programmed cell death operate within mitochondria. Biogenesis of mitochondria is a highly complex process: 1) since eukaryotic cell cannot create mitochondria *de novo*, it has to ensure their division and propagation during the reproduction and segregation to newly formed cells. 2) Most proteins and other compounds have to be transported to the mitochondria to ensure essential mitochondrial function. For this purpose, cells evolved an elaborated protein import pathway and highly regulated transporters of other necessary compounds.

Trypanosoma brucei is a medically and veterinary important unicellular parasite of humans and other animals transmitted by tse-tse flies in Africa. Different environments inside these two types of hosts rise different demands on trypanosomal metabolism and response to the host immunity. A single mitochondrion that is present in the trypanosome cell is particularly

interesting for its dramatic metabolic and morphological changes between bloodstream (BSF) and insect forms (PCF). In this work, I review current knowledge on trypanosome mitochondrial energy metabolism, protein translocation and processing and iron transport and metabolism and provide comparison of these pathways with mitochondria of model eukaryotes *Saccharomyces cerevisiae* and *Homo sapiens*. The work is focused mainly on several specific pathways that can help us to understand evolution and function of *T. brucei* mitochondria. Most prominent differences of *T. brucei* energy metabolism are the tricarboxylic acid (TCA) cycle, which does not work as a cycle, despite the fact that all the TCA cycle enzymes are present (van Hellemond *et al*, 2005; Tielens & van Hellemond, 2009) and unusual oxidative phosphorylation with two uncommon enzymes supplying electrons (glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Guerra *et al*, 2006) and alternative NADH dehydrogenase (Fang & Beattie, 2002)), alternative terminal oxidase and ATP synthase that in the bloodstream form operates in the opposite way. Highly divergent is also protein translocation pathway consisting of trypanosome specific archaic translocase of the outer mitochondrial membrane (Pusnik *et al*, 2011) and single pore-forming protein within inner membrane (Singha *et al*, 2008). Parasites such as *T. brucei*, which lives in different hosts, have to be very malleable and adapt their iron import and handling mechanisms. Iron import is largely dependent on the life stage and involves *T. brucei* specific proteins. Moreover, trypanosomes belong among organisms which lost its heme synthesis pathway and need to acquire heme from the host (Kořený *et al*, 2010). Most of the iron is used within the Fe-S cluster assembly pathway, which has been intensively studied in *T. brucei* and it was shown that it is comparable to other model eukaryotes.

The aims of the thesis

- 1) To characterize processing of mitochondrial targeting sequences with focus on:
 - a. Characterization of N-terminal mitochondrial targeting sequences.
 - b. Characterization of mitochondrial processing peptidase
 - c. Phylogenetic analysis of mitochondrial core proteins and mitochondrial processing peptidase.
- 2) To characterize putative pyruvate transporter in different *T. brucei* life stages.
- 3) To characterize mechanisms of iron uptake in insect stage of *T. brucei*.

Material and methods

All the material and methods are stated in the original publications; here I will list only several of the most important methods:

- preparation of recombinant proteins in *Escherichia coli* and antibodies in rats
- protein localization by immunofluorescent microscopy and SDS-PAGE followed by Western blot analysis
- *T. brucei* cellular fractionation and enzymatic activities measurement
- *in silico* analysis (phylogenetic tree construction, alignment, etc.)
- HPLC analysis

Results and discussion

Evolutionary origin of trypanosomal mitochondrion is a long discussed issue. There are two contradictory opinions, whether it is an ancient or highly divergent organelle. Initial identifications of short N-terminal mitochondrial targeting sequences (N-MTS) and distinct mitochondrial translocase machinery were interpreted as an ancient feature; on the contrary, we shown that highly derived and missing machineries may reflect diversification and adaptation to parasitism.

Analysis of *T. brucei* N-MTS that were predicted in 336 mitochondrial proteins shows no significant difference in net charge, length and cleavage site motif in comparison to canonical N-MTSs of *Saccharomyces cerevisiae*. In the genome of *T. brucei*, we found canonical α and β subunits of mitochondrial processing peptidase (MPP) with glycine rich loop and zinc binding domain, respectively and two subunits of MPP paralogs, the core proteins (cp1 and cp2) that are associated with respiratory complex III, but without domain required for the processing activity. Phylogenetic analysis revealed that all eukaryotic lineages include members of the same type MPP/core protein family, whereas cp1 subunit evolved independently from β -MPP duplication in metazoans, some fungi and kinetoplastids. We propose that evolution of cp1 allows the independent regulation of mitochondrial respiration and protein import. These results support hypothesis that trypanosomal mitochondrion is not ancient, but rather highly evolved and adapted

for the parasitic lifestyle. Results from characteristics of N-MTS and processing peptidases were published in the article: Mach *et al.* (2013) *Genome Biol Evol.* 5(5):860-75.

Pyruvate is a key intermediate of energetic metabolism of PCF and end-product of BSF. For many years it was known, that pyruvate is actively transported across mitochondrial membrane and that transport is driven by pH, co-transport one proton, and the pyruvate transport is inhibited by compound UK-5099. However, molecular character of putative pyruvate transporter was not known until recently. The mitochondrial pyruvate carrier (MPC) appeared to comprise of two paralogous proteins MPC1 and MPC2. We found homologs of both proteins in *T. brucei* genome. They are both localized within mitochondrial membrane and we demonstrated that they are indeed responsible for import of pyruvate to mitochondria. Surprisingly, decrease of pyruvate import in the cells without MPC is only partial, which raises the question what is responsible for the rest of the transported pyruvate. MPC is not essential for the trypanosomal growth in the glucose-rich cultivation medium, but in the glucose-depleted medium, the growth of BSF was significantly slower. Experimental infection of mice revealed that the strain with impaired MPC function caused lower parasitemia as well as mortality in comparison with the wild type *T. brucei* strain. Within the MPC ablated PCF and BSF cells, we observed dramatic changes in the glucose metabolism. We hypothesize that pyruvate may be necessary for mitochondrial alanine production by glutamate dehydrogenase and that other transporter or pathway participates in pyruvate import to mitochondrion. Results of MPC study were published in the article: Štáfková *et al.*, (2016). *Mol Microbiol.* [Epub ahead of print].

Mechanism of iron acquisition by BSF has been elucidated many years ago, however this process remain unknown for PCF cells. BSFs utilize a specific receptor for transferrin to acquire sufficient amount of iron. We found that PCF are able to utilize different source of iron in the environment than the BSF in mammalian host. Within the insect host, the uptake of transferrin is not involved in iron acquisition. We show that PCF *T. brucei* takes up iron via reduction of low molecular weight ferric complexes and subsequent transport of ferrous iron. We found possible ferric reductase in the genome of *T. brucei*, as well as several putative metal transporters that can participate in iron uptake. The efficiency of ferrous iron import is comparable to process previously described in yeast. Reduction of the ferric complexes and subsequent iron import can be essential especially in the insect environments without mammalian host transferrin and with

particular emphasis to full development of PCF mitochondrion. Results of iron import to PCF were published in the article: Mach *et al*, (2013) J Parasitol. 99(2):363-4.

References

- Adl S.M., Simpson A.G.B., Lane C.E., Lukeš J., Bass D. et al (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59**: 429–493
- Fang J. and Beattie D.S. (2002). Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* **123**: 135–142
- Guerra D.G., Decottignies A., Bakker B.M. and Michels P.A.M. (2006). The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosomatidae* and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania spp.* *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**: 155–169
- van Hellemond J.J., Opperdoes F.R. and Tielens A.G.M. (2005). The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 967–971
- Kořený L., Lukeš J. and Oborník M. (2010). Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all? *Int. J. Parasitol.* **40**: 149–156
- Lang B.F., Gray M.W. and Burger G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 351–97
- Lombardo M.E., Araujo L.S. and Batlle A. (2003). 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 1263–71
- Martin W.F., Garg S. and Zimorski V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**: 20140330
- Pittis A.A. and Gabaldón T. (2016). Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature*: [Epub ahead of print]
- Pusnik M., Schmidt O., Perry A.J., Oeljeklaus S., Niemann M. et al (2011). Mitochondrial preprotein translocase of trypanosomatids has a bacterial origin. *Curr. Biol.* **21**: 1738–1743

- Salzman T.A., Stella A.M., Wider de Xifra E.A., Batlle A.M., Docampo R. et al (1982). Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **72**: 663–7
- Singha U.K., Peprah E., Williams S., Walker R., Saha L. et al (2008). Characterization of the mitochondrial inner membrane protein translocator Tim17 from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **159**: 30–43
- Tielens A.G.M. and van Hellemond J.J. (2009). Surprising variety in energy metabolism within *Trypanosomatidae*. *Trends Parasitol.* **25**: 482–490
- Verner Z., Basu S., Benz S., Dixit S., Dobáková E. et al (2015). Malleable mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **315**: 73–151
- Verner Z., Škodová I., Poláková S., Durišová-Benkovičová V., Horváth A. et al (2012). Alternative NADH dehydrogenase (NDH2): intermembrane-space-facing counterpart of mitochondrial complex I in the procyclic *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **140**: 328–37

Publications

- Štáfková J, Mach J, Biran M, Verner Z, Bringaud F, Tachezy J. (2016). Mitochondrial pyruvate carrier in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* [Epub ahead of print]. (IF = 4,4)
- Mach J, Poliak P, Matusková A, Žárský V, Janata J, Lukeš J, Tachezy J. (2013). An advanced system of the mitochondrial processing peptidase and core protein family in *Trypanosoma brucei* and multiple origins of the core I subunit in eukaryotes. *Genome Biol Evol.*, 5(5):860-75. (IF = 4,2)
- Mach J, Tachezy J, Štuřák R. (2013). Efficient iron uptake via a reductive mechanism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Parasitol.*, 99(2):363-4. (IF = 1,2)

Curriculum vitae

Name: Jan Mach
Date of birth: 29.4.1983
Work address: Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Parasitology, Biocev, Průmyslová 595, Vestec 252 42, Czech Republic
E-mail: mach@natur.cuni.cz

Education:

2008 - present Postgraduate student and researcher at the Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

2005 - 2008 Master degree in Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic
Master thesis: Role of mitochondria in maturation of FeS proteins in cytosol of *Trypanosoma brucei*

2001 - 2005 Bachelor degree in Biology, Department of Parasitology, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic
Bachelor thesis: Phylogenetic analyses of LSU rDNA and myosin heavy chain type II of selected species of myxosporea

Qualifications:

2014 Clarity Chromatography Software (DataApex) training

2012 and 2014 Course in the care and use of experimental animals in science

2009 Course „Biology of Parasitism: Modern Approaches“ – Woods Hole, MA, USA

Publications:

Štáfková J, Mach J, Biran M, Verner Z, Bringaud F, Tachezy J. (2016). Mitochondrial pyruvate carrier in *Trypanosoma brucei*. Mol Microbiol. [Epub ahead of print].

Nývltová E, Stairs CW, Hrdý I, Rídl J, Mach J, Pačes J, Roger AJ, Tachezy J. (2015). Lateral gene transfer and gene duplication played a key role in the evolution of *Mastigamoeba balamuthi* hydrogenosomes. Mol Biol Evol., 32(4):1039-55.

Mach J, Poliak P, Matusková A, Žárský V, Janata J, Lukeš J, Tachezy J. (2013). An advanced system of the mitochondrial processing peptidase and core protein family in *Trypanosoma brucei* and multiple origins of the core I subunit in eukaryotes. Genome Biol Evol., 5(5):860-75.

Mach J, Tachezy J, Štuřák R. (2013). Efficient iron uptake via a reductive mechanism in procyclic *Trypanosoma brucei*. J Parasitol., 99(2):363-4.

Long S, Jirků M, Mach J, Ginger ML, Sutak R, Richardson D, Tachezy J, Lukeš J. (2008). Ancestral roles of eukaryotic frataxin: mitochondrial frataxin function and heterologous expression of hydrogenosomal *Trichomonas* homologues in trypanosomes. Mol Microbiol., 69(1):94-109.

International conferences:

- 2015 Sixth Congress of the International BioIron Society, Hangzhou, China
 „Iron import to unusual *Trypanosoma brucei* mitochondria - The role of mitoferrin homolog“
- 2014 Gordon Research Conference - Mitochondria & Chloroplasts, Barga, Italy
 „Mitochondrial pyruvate transporter of *Trypanosoma brucei*“
- 2012 50. British Society for Parasitology meeting, Glasgow, UK
 „Mitochondrial processing peptidase of *Trypanosoma brucei*“

- 2011 22nd Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, MA, USA
 „Mitochondrial processing peptidase of *Trypanosoma brucei*“
- 2010 International Symposium - Evolution of Protein Translocation Systems, Frankfurt am Main, Germany
- 2007 18nd Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, MA, USA
 „Frataxin is the essential protein in FeS cluster biosynthesis in mitochondria and hydrogenosomes“
- 2005 12th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Copenhagen, Denmark

Financial support

Grant Agency of Charles University (GAUK) – project number 62209 (Jan Mach)

Grant Agency of Czech Republic (GAČR) – project number P305/11/2179

Czech Ministry of Education grant – project number MSM0021620858 (Jan Tachezy)

University Research Centers (UNCE), Charles University in Prague – project number 204017